



<b>Title</b>	<b>Strontium fortified calcium nano- and microparticle compositions and methods of making and using thereof</b>
<b>Inventor(s)</b>	<b>Lu, WW; Li Zhaoyang; Lam Wingmoon Raymond; Luk Dipkei Keith</b>
<b>Citation</b>	<b>China Published Patent Application CN 101715350. Beijing, PRC: State Intellectual Property Office (SIPO) of the P.R.C., 2010</b>
<b>Issued Date</b>	<b>2010</b>
<b>URL</b>	<b><a href="http://hdl.handle.net/10722/176629">http://hdl.handle.net/10722/176629</a></b>
<b>Rights</b>	<b>Creative Commons: Attribution 3.0 Hong Kong License For Public Patent Documents</b>



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101715350 A

(43) 申请公布日 2010.05.26

(21) 申请号 200880021520.3

(22) 申请日 2008.06.23

(30) 优先权数据

60/945,680 2007.06.22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.12.22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2008/001211 2008.06.23

(87) PCT申请的公布数据

W02009/000158 EN 2008.12.31

(71) 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

(72) 发明人 吕维加 李朝阳 林荣满 陆颀骥

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李进 李炳爱

(51) Int. Cl.

A61L 27/12(2006.01)

A61L 27/32(2006.01)

A61L 31/02(2006.01)

A61K 6/033(2006.01)

C01B 25/32(2006.01)

C25D 13/02(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 4 页

(54) 发明名称

锶强化钙纳米颗粒和微粒组合物及其制备和使用方法

(57) 摘要

本文描述了含锶强化钙纳米颗粒和 / 或微粒的组合物,及其制备和使用方法。锶强化钙化合物含钙离子、钙原子、锶离子、锶原子及其组合和一种或多种阴离子。示例性的阴离子包括但不限于柠檬酸根、磷酸根、碳酸根及其组合。通过将颗粒加入到药用载体中可将颗粒配制用于肠或肠胃外给药。这些组合物还可含一种或多种可用于骨病或障碍的活性剂,例如维生素 D、生长因子及其组合。这些组合物可用于治疗或预防一种或多种骨病或障碍,例如骨质疏松症。或者,颗粒可涂覆于基体上,例如植入物的表面上。涂层可用于改善植入物的生物相容性,防止植入物的松弛,减少金属离子从金属植入物的浸出及减少腐蚀。涂层可用本领域熟知的各种技术涂覆于基体。在一个实施方案中,涂层用电泳沉积法涂覆。采用提供高表面积纳米颗粒和 / 或微粒有助于改善涂层和植入物之间的界面强度,这允许采用较低的烧结温度。降低烧结温度能防止或使涂料的热分解和 / 或植入物材料的降解最小化。

1. 一种药用组合物,所述组合物包含含有一种或多种锶强化钙化合物的纳米颗粒、微粒或其组合,其中所述一种或多种锶强化钙化合物包含钙离子和锶离子及一种或多种选自以下的阴离子:磷酸根、柠檬酸根、碳酸根及其组合。

2. 权利要求1的组合物,所述组合物配制或选自片剂、胶囊剂、胶囊形片剂、溶液剂、糖浆剂和混悬剂的口服剂型。

3. 权利要求1的组合物,所述组合物为植入物上的涂层形式。

4. 权利要求1的组合物,所述组合物为骨接合剂或填料的形式。

5. 权利要求4的组合物,所述组合物还包含粘合剂。

6. 权利要求5的组合物,其中所述粘合剂是硫酸钙。

7. 权利要求1的组合物,其中所述颗粒为纳米丝的形式。

8. 权利要求1的组合物,其中所述纳米颗粒的直径为至少约10nm,且所述微粒的直径在约10-约250微米之间。

9. 一种治疗骨病或障碍的方法,所述方法包括给予有效量的组合物,该组合物包含含有一种或多种锶强化钙化合物的纳米颗粒、微粒或其组合,其中所述一种或多种锶强化钙化合物包含钙离子和锶离子及一种或多种选自以下的阴离子:磷酸根、柠檬酸根、碳酸根及其组合。

10. 权利要求9的方法,其中所述骨病或障碍是骨质疏松症。

11. 权利要求9的方法,其中所述组合物为选自以下的口服剂型形式:片剂、胶囊剂、胶囊形片剂、溶液剂、糖浆剂和混悬剂。

12. 权利要求9的方法,其中所述组合物为植入物上的涂层形式。

13. 权利要求9的方法,其中所述组合物为骨接合剂或填料的形式。

14. 权利要求13的方法,其中所述组合物还包含粘合剂。

15. 权利要求13的方法,其中所述粘合剂是硫酸钙。

16. 权利要求8的方法,其中所述纳米颗粒的直径为至少约10nm,且所述微粒的直径在约10-约250微米之间。

17. 一种将锶强化钙纳米颗粒、微粒及其组合涂覆于基体的方法,所述方法包括将包含一种或多种锶强化钙化合物的高表面积纳米颗粒、微粒及其组合电泳沉积,其中所述一种或多种锶强化钙化合物包含钙离子和锶离子及一种或多种选自以下的阴离子:磷酸根、柠檬酸根、碳酸根及其组合,其中将所沉积的材料于小于800℃的温度下烧结。

18. 权利要求17的方法,其中所述颗粒的尺寸为约10nm-约250μm。

19. 权利要求17的方法,其中所述基体选自钽、钴、铬、钴合金、铬合金、钛、钛合金、陶瓷及其组合。

20. 权利要求17的方法,其中所述涂料还包含促进骨结合的材料。

21. 权利要求17的方法,其中所述涂料促进间质干细胞的分化或成骨细胞的增殖。

22. 权利要求16的方法,其中所述涂层是多孔或无孔的。

## 锶强化钙纳米颗粒和微粒组合物及其制备和使用方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求享有 2007 年 6 月 22 日递交的标题为“用于植入物表面涂覆及骨质疏松症和骨病的治疗 / 预防的纳米和微米锶强化钙化合物”的 U. S. S. N. 60/945, 680 的优先权。上述申请中的公开内容通过引用结合到本文中。

### 发明领域

[0003] 本申请涉及用作植入物涂层、填料和支架材料的锶强化钙纳米颗粒和 / 或微粒组合物, 以及用于骨质疏松症和其他骨病及障碍治疗的药用组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 随着人口的老龄化, 骨质疏松症不断变得更流行。通过降低骨的拉伸强度和压缩强度骨质疏松症可以戏剧性的增加骨折的危险。骨再造的不平衡是骨质疏松症的主要原因。整个生命过程中, 旧的骨头不断地被骨再吸收破骨细胞除去, 并被以高度规则的方式由成骨细胞形成的新骨头取代。在老化或病理情况下, 骨再吸收的速度超过新骨形成的速度, 从而导致骨质疏松症。

[0006] 给予维生素 D 加钙已用于治疗骨质疏松症。虽然该制剂是安全的, 但是它已显示在逆转骨损失上是无效的。钙和维生素 D 补充剂已与其他合成代谢的或抗再吸收药物联合给药用于骨质疏松症的治疗。然而, 这些治疗也相对无效。在骨质疏松症患者中, 仅进行钙补充剂治疗不能明显地改善骨矿物质的密度。虽然已经显示高血清钙浓度抑制了再吸收 (这解释了钙补充剂为什么可以减少骨质疏松症患者的骨损失), 但是钙没有诱导用于合成新的基质物质的成骨细胞形成, 因此尽管有适当的血清钙水平, 新的骨还是不能形成。

[0007] 锶盐已经显示出能够促进骨形成和延迟骨再吸收。在体外锶能增加成熟成骨细胞胶原和非胶原蛋白的合成。 $10^{-3}\text{M}$  或更高的锶浓度已显示增加了 34% 的胶原和非胶原蛋白的合成。锶盐具有大治疗范围 (例如 10-2000mg) 和显示低毒性。

[0008] 锶二价阳离子 (通常为锶盐的形式) 已显示能通过直接的和 / 或基质介导的破骨细胞活性和分化的抑制抑制骨再吸收。破骨细胞活性和分化的抑制解释了锶的抗再吸收性质。在甲状旁腺素诱导的骨质疏松症小鼠模型中, 雷奈酸锶 (strontium ranelate) 抑制骨的再吸收。它增加了成纤维细胞中三 - 四倍 DNA 的合成和富含前成骨细胞的细胞总数, 也提高了前成骨细胞的细胞复制。

[0009] 锶离子能增加雄性 (53%) 和雌性大鼠 (56%) 的碱性磷酸酯酶的活性。也观察到 104 周的治疗后雄性的血浆 IGF-I 显著增加, 但是雌性的未增加。已知 IGF-I 能增加成骨细胞的合成、刺激骨基质对合和骨胶原合成及骨生长。锶已显示能增加大鼠模型的血清钙浓度, 同时降低总蛋白浓度。

[0010] 已经进行了锶 - 钙组合物的研究。Aoki 等的美国专利 No. 5, 442, 536 公开了植入物材料, 这些材料通过用磷酸钙类型的化合物涂覆芯材料并将该涂层通过热水处理转化成磷灰石类型的陶瓷层制备。所公开的磷灰石类型层的选项有磷酸钙、锶磷灰石、镁磷灰石、氯磷灰石、氟磷灰石和碳酸磷灰石。

[0011] Li 的美国专利 No. 6, 905, 723 公开了用锶取代的陶瓷磷灰石涂层制备植入物的方法。该方法涉及将该植入物的表面与含锶离子、钙离子、磷酸根离子和液体载体的组合物一起温育。

[0012] Carpena 等的美国专利 No. 6, 338, 810 公开了制备用于生物学用途的磷灰石陶瓷的方法。该' 810 专利公开了在磷灰石陶瓷结构中包括锶是有用的, 因为它能促进骨再生。

[0013] Kale 等的美国专利申请 No. 2002/0127711 公开了哺乳动物骨的离体形成, 及该骨的后继用途。Kale 描述了产生骨的方法, 该方法通过获得成骨细胞或骨前体细胞、在骨原生长因子的存在下, 培养该细胞并建立细胞培养物, 使得骨在所产生的骨细胞球状体的细胞内形成。在一个实施方案中, 细胞通过非生物学基质导入机体, 该基质可含有锶强化的钙羟磷灰石。

[0014] Boudeville 等的美国专利申请 No. 2008/0027455 公开了含矿物质固相 (含锶强化钙组合物)、液相和任选聚合物微粒的可注射接合剂。矿物质固相由具有摩尔组成  $(\text{CP})_6(\text{CsO})_y(\text{SrCO}_3)_z$  的粉末的混合物组成。在两种或三种这些化合物的混合物中, 这些组合物包含脱水磷酸氢钙 (DCPD)、无水磷酸氢钙 (DCPA)、无水混合的磷酸氢钙锶、双 (磷酸二氢) 钙一水合物 (MCPM) 和氧化钙的等摩尔混合物。

[0015] Versitech, Ltd. (" Versitech" ) 的 PCT 申请 WO 01/49327 公开了用于植入物材料的粘合或固定以及损害的骨材料的加强的骨接合剂组合物。这些组合物包含含锶的羟磷灰石和含双酚 A 二缩水甘油醚二甲基丙烯酸酯树脂的液体组分。当混合在一起时, 这两种组分产生可固化的流体物质。

[0016] 在用于口服给药的制剂中, 特别是在通过调节钙与锶的比例优化时, 上述参考文献中无一公开或提出了柠檬酸钙锶或锶取代的磷酸三钙。此外, 先有技术中无一公开了锶强化钙药物制剂。

[0017] 美国专利 No. 6, 593, 394 中公开了由锶强化钙羟磷灰石形成的涂层。然而, 该专利未公开以下的涂层也未使该涂层显而易见: 该涂层由柠檬酸锶或锶取代的磷酸三钙形成, 尤其是基于钙与锶的比例优化, 或通过电泳沉积涂覆, 该涂层显示出能提供比羟磷灰石涂层更好的特性。先有技术中无一公开了锶强化钙的纳米颗粒或微粒。

[0018] 对锶强化钙组合物存在需求, 该锶强化钙组合物用于治疗骨质疏松症和其他骨病和障碍的植入物涂层和药用组合物中。

[0019] 因此, 本发明的目的是提供锶强化钙组合物, 及其制备和使用方法。

[0020] 发明概述

[0021] 本文描述了含锶强化钙纳米颗粒和 / 或微粒的组合物, 及其制备和使用方法。锶强化钙颗粒含钙离子、钙原子、锶离子、锶原子及其组合和一种或多种阴离子。示例性的阴离子包括但不限于柠檬酸根、磷酸根、碳酸根及其组合。优选的锶强化钙化合物的实例包括但不限于柠檬酸钙 / 锶和锶取代的磷酸三钙。

[0022] 通过将颗粒加入到药用载体中, 可将颗粒配制用于肠或肠胃外给药。这些组合物还可含一种或多种药学上可接受的赋形剂。合适的口服剂型包括片剂、软或硬明胶或非明胶胶囊剂、胶囊形片剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和振摇剂。对肠胃外给药而言, 通常将微粒悬浮在药学上可接受的注射溶剂中。这些组合物还可含一种或多种可用于骨病或障碍的活性剂, 例如维生素 D、生长因子及其组合。这些组合物可用于治疗或预防一种或多种骨病或

障碍,例如骨质疏松症。

[0023] 或者,可将颗粒涂覆在基体上,例如植入物的表面。涂层可用于改善该植入物的生物相容性、防止该植入物的松弛、减少金属离子从金属植入物的浸出及减少腐蚀。可用本领域熟知的各种技术,将涂层涂覆在基体上。在一个实施方案中,用电泳沉积法涂覆涂层。采用提供高表面积 of 纳米颗粒和 / 或微粒有助于改善涂层与植入物之间的界面强度,这允许使用较低的烧结温度。降低烧结温度能防止涂料的热分解和 / 或植入物材料的降解或使其最小化。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1 是柠檬酸钙和柠檬酸锶的傅立叶变换红外 (FTIR) 图谱。

[0026] 图 2 是锶取代的磷酸三钙的 FTIR 图谱。

[0027] 图 3 是锶取代的磷酸三钙混合物的 X- 射线衍射 (XRD) 图谱。

[0028] 图 4 是作为给药制剂的函数 (对照、Ca 单独、Ca+L. Sr 和 Ca+H. Sr) 显示血清锶水平 (%) 的图。Ca+L. Sr 含 100mg Ca/kg/ 天和 24mg Sr/kg/ 天。Ca+H. Sr 含 100mg Ca/kg/ 天和 40mg Sr/kg/ 天。

[0029] 图 5 是作为给药制剂的函数 (对照、Ca 单独、Ca+L. Sr 和 Ca+H. Sr) 显示股骨和腰椎骨中锶水平 (%) 的图。Ca+L. Sr 含 100mg Ca/kg/ 天和 24mg Sr/kg/ 天。Ca+H. Sr 含 100mg Ca/kg/ 天和 40mg Sr/kg/ 天。

[0030] 图 6 是作为给药制剂的函数 (对照、Ca 单独、Ca+L. Sr 和 Ca+H. Sr) 显示各种靶基因: IGF-1、IGF-II、TNF- $\alpha$  和 Runx2 表达的图。Ca+L. Sr 含 100mg Ca/kg/ 天和 24mg Sr/kg/ 天。Ca+H. Sr 含 100mg Ca/kg/ 天和 40mg Sr/kg/ 天。

[0031] 图 7 是显示各种制剂在第 7、14 和 21 天的 ALP 活性 (mol/mim/mg) 的图。

[0032] 发明详述

[0033] I. 定义

[0034] “锶强化钙盐”和“锶取代的钙化合物”可互换使用,并指含钙离子、元素钙、锶离子、元素锶及一种或多种阴离子的化合物。示例性的阴离子包括但不限于柠檬酸根、磷酸根、碳酸根及其组合。实例包括但不限于柠檬酸钙 / 锶和锶取代的磷酸三钙。钙化合物和锶化合物的混合物也在该定义的范围內。

[0035] “纳米颗粒”,如本文使用,指纳米 (nm) 范围内的颗粒或结构,通常直径为约 0.1nm- 约 1000nm。

[0036] “微粒”,如本文使用,通常指尺寸相对小的颗粒,但不必需在微米尺寸范围内;该术语用于表示尺寸可小于 50nm-1000 微米或更大的颗粒。在一个实施方案中,颗粒的直径为约 5- 约 100 微米,优选约 10- 约 50 微米,更优选约 10- 约 25 微米。如本文使用,微粒包括微球、微囊和微粒,除非另外说明。微粒和纳米颗粒的相对尺寸可使后者掺入到前者中。微粒或纳米颗粒可以是复合结构并且不必是纯物质;它可以是球形或任何其他形状。

[0037] II. 组合物

[0038] 本文描述了锶强化钙化合物的纳米颗粒和微粒及其制备和使用方法。锶强化钙化合物含两种主要组分,即钙化合物或铁,锶化合物或铁。在一个实施方案中,颗粒由一种或多种钙化合物和一种或多种锶化合物的混合物形成。在另一个实施方案中,颗粒由其中某些钙离子被锶离子替代的钙化合物 (锶强化钙化合物) 形成。锶强化钙化合物可以是用于

口服给药的药用组合物、植入物涂层、支架材料的形式,或其他形式,例如可注射的骨接合剂或填料。

[0039] 锶强化钙盐可改善由老化和某些病理状况中变质的成骨细胞功能引起的骨强度。成骨细胞合成新骨的基质,并转运钙离子使矿物化并填充再吸收腔。钙和锶化合物或锶强化钙化合物的混合物可激活成骨细胞,并为骨矿物化提供足够的钙。由于较高的成骨细胞合成代谢活性和较高的矿物化速率,改善了骨的整体密度和强度。钙比锶也具有占领钙转运蛋白的竞争优势。钙比锶的转运蛋白亲和力仅是 2 : 1,这意味着即使大量摄取钙,少量的锶也可被吸收,并刺激成骨细胞活性。

[0040] A. 锶强化钙纳米颗粒和微粒

[0041] 在此描述的组合物含有一种或多种锶强化钙化合物,例如盐,通常为纳米颗粒或微粒的形式。盐包含钙离子、钙原子、锶离子、锶原子及其组合和一种或多种阴离子。示例性的阴离子包括但不限于柠檬酸根、磷酸根、碳酸根及其组合。优选的锶强化钙化合物的实例包括但不限于柠檬酸钙 / 锶和锶取代的磷酸三钙。

[0042] 磷酸三钙几乎不溶于水,并依靠在胃中的置换反应以溶解该物质。在磷酸三钙 / 锶中加入锶可以改善该化合物的溶解性。二柠檬酸三钙 / 柠檬酸锶可溶解于水,并较少依靠置换反应。在一个实施方案中,盐是 Ca : Sr : 磷酸根原子比为 27 : 3 : 20 的磷酸三钙 / 锶。在另一个实施方案中,该组合物含 Ca : Sr : 柠檬酸根原子比为 33 : 6 : 28 的柠檬酸钙和柠檬酸锶的混合物。Ca : Sr 比可通过改变锶和 / 或钙源比率或通过再加入一种或多种钙或锶盐来调节。优选的 Ca : Sr 比率是约 9 : 1- 约 8 : 2。在一个实施方案中,锶强化钙化合物含约 1- 约 40% (摩尔)。

[0043] 纳米尺寸的磷酸锶颗粒通常具有更高的表面与体积比,因此比微米尺寸的颗粒更可生物再吸收。通过改变纳米颗粒与微粒的比率,可调节混合物的溶出速率,以适应不同的矫形应用例如要求低溶解性的涂层。对骨接合剂填料而言,可增加溶出速率以促进骨的向内成长。在口服制剂中,混合物可大部分含具有更高溶出速率的纳米颗粒。锶的释放速度通过调节钙 / 锶比率和纳米 / 微米比率控制,以避免不良的毒性。

[0044] 颗粒的直径在约 0.01nm- 约 1000 微米的范围内。在一个实施方案中,颗粒的直径在约 50nm- 约 25 微米的范围内。

[0045] B. 药用组合物

[0046] 锶强化钙纳米颗粒和 / 或微粒可配制成药用组合物。在一个实施方案中,纳米颗粒和 / 或微粒配制成口服给药。口服剂型可以是固体或液体。合适的固体口服剂型包括但不限于片剂、软或硬明胶或非明胶胶囊剂和胶囊形片剂。合适的液体剂型包括但不限于溶液剂、混悬剂和糖浆剂。

[0047] 1. 载体、添加剂和赋形剂

[0048] 含纳米颗粒和 / 或微粒的药用组合物还可含有一种或多种药学上可接受的赋形剂、载体和添加剂。如本文使用,“载体”是除一种或多种活性成分以外的存在于药物制剂中的所有组分。术语“载体”包括但不限于溶剂、悬浮剂、分散剂、缓冲剂、pH 调节剂、等渗调节剂、防腐剂、抗微生物剂及其组合。

[0049] 其他添加剂包括可用于处理或制备颗粒的那些,可有助于锶强化钙盐的掺入或稳定性,或可用于改变颗粒的性能。

[0050] 颗粒可含有其他赋形剂,这些赋形剂包括任何一些其他医学上或药学上可接受的赋形剂例如防腐剂、脂质、脂肪酸、蜡、表面活性剂、增塑剂、成孔剂、抗氧化剂、增量剂、缓冲剂、螯合剂、助溶剂、水溶性试剂、不溶性试剂、金属阳离子、阴离子、盐、渗透剂、合成聚合物、生物聚合物、亲水性聚合物、多糖、糖、疏水性聚合物、亲水性嵌段共聚物、疏水性嵌段共聚物、含亲水性和疏水性嵌段的嵌段共聚物。此类赋形剂在制备微粒组合物时可单独使用,或以两种或多种赋形剂的组合使用。除了别的特性外,这些赋形剂可用于改变或影响药物释放、水摄取、聚合物降解、生物活性剂的稳定性的顺序。

[0051] 在制备此类颗粒期间可掺入一种或多种赋形剂。水溶性和亲水性赋形剂的实例包括聚乙烯吡咯烷酮或 PVP,和含一个或多个 PVP 嵌段与其他生物相容性聚合物嵌段的共聚物(例如聚(丙交酯)或丙交酯-乙交酯共聚物或聚己内酯);聚(乙二醇)或 PEG 和含 PEG 嵌段与其他生物相容性聚合物嵌段的共聚物(例如聚(丙交酯)或丙交酯-乙交酯共聚物或聚己内酯);聚(环氧乙烷)或 PEO,及含一个或多个 PEO 嵌段与其他生物相容性聚合物嵌段的共聚物(例如聚(丙交酯)或丙交酯-乙交酯共聚物或聚己内酯)以及含 PEG 和聚(环氧丙烷)的嵌段共聚物或 PPO,例如 PEO-PPO-PEO 的三嵌段共聚物(例如泊洛沙姆™、普朗尼克(Pluronic)™);及含乙二胺的 PPO 和 PEO 的改性共聚物(Poloxamines™ 和 Tetronics™)。在其他方面,微粒组合物可制成含有一种或多种生物活性剂或一种或多种赋形剂或其组合。

[0052] 载体也包括涂层组合物的所有组分,这些组分可包括增塑剂、颜料、着色剂、稳定剂和助流剂。延迟释放、延长释放和/或脉冲释放剂量制剂可按照标准参考文献的描述制备,例如“药用剂型片剂(Pharmaceutical dosage form tablets)”,Lieberman 等编辑(New York,Marcel Dekker,Inc.,1989),“Remington-药剂学科学和实践(Remington-The science and practice of pharmacy)”,第 20 版,Lippincott Williams & Wilkins,Baltimore,MD,2000,和“药用剂型和药物递送系统(Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems)”,第 6 版,Ansel 等(Media,PA:Williams and Wilkins,1995)。这些参考文献提供了关于制备片剂和胶囊剂以及片剂、胶囊剂和颗粒剂的延迟释放剂型的载体、材料、设备和方法的信息。

[0053] 合适的涂料的实例包括但不限于纤维素聚合物,例如邻苯二甲酸乙酸纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素和琥珀酸乙酸羟丙基甲基纤维素;聚邻苯二甲酸乙酸乙烯酯、丙烯酸聚合物和共聚物,及商业上可以商品名 EUDRAGIT® (RothPharma, Westerstadt, Germany) 得到的甲基丙烯酸树脂、玉米蛋白、虫胶和多糖。

[0054] 此外,涂料可含有常规载体例如增塑剂、颜料、着色剂、助流剂、稳定剂、成孔剂和表面活性剂。

[0055] 存在于含药物的片剂、珠剂、颗粒剂或颗粒中的任选的药学上可接受的赋形剂包括但不限于稀释剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、着色剂、稳定剂和表面活性剂。

[0056] 稀释剂,也称为“填料”,通常必需增加固体剂型的体积,以便为片剂的压缩或珠剂和颗粒剂的形成提供实际尺寸。合适的稀释剂包括但不限于磷酸二钙二水合物、硫酸钙、乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、纤维素、微晶纤维素、高岭土、氯化钠、干淀粉、水解淀粉、预胶化淀粉、二氧化硅、氧化钛、硅酸镁铝和粉状糖。



[0057] 粘合剂用于赋予固体剂量制剂粘合在一起的质量,因此确保片剂或珠剂或颗粒剂在剂型形成后保持完整。合适的粘合剂材料包括但不限于淀粉、预胶化淀粉、明胶、糖(包括蔗糖、葡萄糖、右旋糖、乳糖和山梨醇)、聚乙二醇、蜡、天然和合成胶例如阿拉伯胶、黄芪胶、藻酸钠、纤维素包括羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、乙基纤维素,及硅酸铝镁(veegum),和合成聚合物例如丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、聚丙烯酸/聚甲基丙烯酸和聚乙烯吡咯烷酮。

[0058] 润滑剂用于促进片剂的制备。合适的润滑剂的实例包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、甘油二十二烷酸酯、聚乙二醇、滑石粉和矿物油。

[0059] 崩解剂用于促进剂型给药后崩解或“破裂”,通常包括但不限于淀粉、淀粉羟乙酸钠、羧甲基淀粉钠、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、预胶化淀粉、粘土、纤维素、海藻素(alginine)、胶或交联聚合物,例如交联PVP(GAF Chemical Corp 的交联聚维酮(Polyplasdone)XL)。

[0060] 稳定剂用于抑制或延迟药物分解反应,作为实例,这些反应包括氧化反应。

[0061] 表面活性剂可以是阴离子、阳离子、两性或非离子表面活性剂。合适的阴离子表面活性剂包括但不限于含羧酸根、磺酸根和硫酸根离子的那些。阴离子表面活性剂的实例包括长链烷基磺酸和烷基芳基磺酸的钠盐、钾盐、铵盐,例如十二烷基苯磺酸钠;琥珀酸二烷基酯磺酸钠,例如十二烷基苯磺酸钠;琥珀酸二烷基酯磺酸钠,例如琥珀酸双-(2-乙基硫氧基(thioxyl))酯磺酸钠;及烷基硫酸盐例如十二烷基硫酸钠。阳离子表面活性剂包括但不限于季铵化合物例如苯扎氯铵、苄索氯铵、西曲溴铵、硬脂基二甲基苄基氯化铵、聚氧化乙烯和椰油胺。非离子表面活性剂的实例包括乙二醇单硬脂酸酯、丙二醇豆蔻酸酯、甘油单硬脂酸酯、甘油硬脂酸酯、聚甘油 4-油酸酯、丙烯酸脱水山梨醇酯、蔗糖丙烯酸酯、PEG-150 月桂酸酯、PEG-400 单月桂酸酯、聚氧乙烯单月桂酸酯、聚山梨醇酯、聚氧化乙烯辛基苯基醚、PEG-1000 十六烷基醚、聚氧乙烯十三烷基醚、聚丙二醇丁基醚、泊洛沙姆® 401、硬脂酰基单异丙醇酰胺及聚氧乙烯氢化牛脂酰胺。两性表面活性剂的实例包括 N-十二烷基-β-丙氨酸钠、N-十二烷基-β-亚胺基二丙酸钠、肉豆蔻酰两性乙酸盐、十二烷基甜菜碱和十二烷基磺基甜菜碱。

[0062] 如果需要,片剂、珠剂、颗粒剂或颗粒也可含有少量非毒性辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、染料、pH 缓冲剂或防腐剂。

[0063] 药物活性神经促进剂与载体和/或其他物质的比例可在约 0.5-约 100wt.%(重量百分比)之间变化。为了口服使用,药物制剂将通常含约 5-约 100%重量的活性物质。对其他用途而言,药物制剂将通常具有约 0.5-约 50wt.%的活性物质。

[0064] 以组合物计,可将一种或多种赋形剂以约 1%-约 90%重量的浓度掺入到颗粒组合物中。

## [0065] 2. 控释制剂

[0066] 本文所描述的颗粒可配制成缓释或控释。在一个实施方案中,颗粒可用缓释或控释涂层涂覆。控释涂层的实例包括延长释放涂层、延迟释放涂层、脉冲释放涂层及其组合。在另一个实施方案中,可将颗粒掺入到控释剂型中,例如延迟释放、延长释放或脉冲释放剂型。

[0067] 延长释放剂型

[0068] 延长释放制剂通常制备成扩散系统或渗透系统,例如,如“Remington-The science and practice of pharmacy”(第20版,LippincottWilliams & Wilkins, Baltimore,MD,2000)中所述。扩散系统通常由两种类型的装置-贮库和骨架组成,并且在本领域是熟知的和充分描述的。骨架装置通常通过将药物与缓慢溶解的聚合物载体一起压缩成片剂形式制备。用于制备骨架装置的三种主要类型的材料是不溶性塑料、亲水性聚合物和脂肪族化合物。塑料骨架包括但不限于丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸甲酯、聚氯乙烯和聚乙烯。亲水性聚合物包括但不限于纤维素聚合物例如甲基和乙基纤维素、羟烷基纤维素例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和卡波普® 934、聚环氧乙烷及其混合物。脂肪族化合物包括但不限于各种蜡例如巴西棕榈蜡和甘油三硬脂酸酯及蜡类型的物质,包括氢化蓖麻油或氢化植物油或其混合物。

[0069] 在某些优选的实施方案中,塑料材料是药学上可接受的丙烯酸聚合物,包括但不限于丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧基乙酯、甲基丙烯酸苄基乙酯、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、甲基丙烯酸烷基胺共聚物、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸)(酸酐)、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚(甲基丙烯酸酐)和甲基丙烯酸缩水甘油酯共聚物。

[0070] 在某些优选的实施方案中,丙烯酸聚合物由一种或多种甲基丙烯酸铵共聚物组成。甲基丙烯酸铵共聚物在本领域是熟知的,并且在 NF XVII 中被描述成丙烯酸和甲基丙烯酸酯与低含量季铵基团的完全聚合共聚物。

[0071] 在一个优选的实施方案中,丙烯酸聚合物是丙烯酸树脂漆例如商业上可从 Rohm Pharma 以商品名 Eudragit® 获得的丙烯酸树脂漆。在进一步优选的实施方案中,丙烯酸聚合物包含商业上可从 RohmPharma 分别以商品名 Eudragit® RL30D 和 Eudragit® RS30D 获得的两种丙烯酸树脂漆的混合物。Eudragit® RL30D 和 Eudragit® RS30D 是丙烯酸和甲基丙烯酸酯与低含量季铵基团的共聚物,Eudragit® RL30D 中的铵基团与其余中性(甲基)丙烯酸酯的摩尔比是 1 : 20,而 Eudragit® RS30D 中的是 1 : 40。平均分子量为约 150,000。Eudragit® S-100 和 Eudragit® L-100 也是优选的。代码命名 RL(高渗透性)和 RS(低渗透性)指这些试剂的渗透性特性。Eudragit® RL/RS 混合物不溶于水和消化液。然而,形成的包含上述物质的多微粒系统在水溶液和消化液中是可膨胀的和可渗透的。

[0072] 上述聚合物例如 Eudragit® RL/RS 可以任何期望的比率混合在一起,以获得具有期望溶出曲线的持续释放制剂。期望的持续释放多微粒系统,例如可由 100% Eudragit® RL、50% Eudragit® RL 和 50% Eudragit® RS, 及 10% Eudragit® RL 和 90% Eudragit® RS 获得。本领域技术人员将认识到,也可使用其他丙烯酸聚合物,例如 Eudragit® L。

[0073] 或者,延长释放制剂可用渗透系统制备,或通过将半渗透性涂层涂覆于剂型上制备。在后者的情况中,所期望的药物释放曲线可通过将低渗透性和高渗透性涂料以合适的比例混合达到。

[0074] 上述具有不同药物释放机制的装置可以组合在最终的剂型中,该最终的剂型包含一个单位或多单位。多单位的实例包括但不限于含片、珠或颗粒的多层片和胶囊。可通过用涂覆或压缩方法,将即释层涂覆于延长释放芯的顶部,或者在多单位系统例如胶囊中包

含延长释放和即释珠,将即释部分加到延长释放系统中。

[0075] 含亲水性聚合物的延长释放片剂用本领域通常已知的技术例如直接压片法、湿法制粒法或干法制粒法制备。其制剂通常掺入聚合物、稀释剂、粘合剂和润滑剂以及活性药物成分。常用的稀释剂包括惰性粉末状物质例如淀粉、粉末状纤维素,尤其是结晶纤维素和微晶纤维素,糖例如果糖、甘露醇和蔗糖,谷物粉及类似可食粉末。典型的稀释剂包括例如各种类型的淀粉、乳糖、甘露醇、高岭土、磷酸钙或硫酸钙、无机盐例如氯化钠和粉状糖。也可使用粉末状纤维素衍生物。典型的片剂粘合剂包括物质如淀粉、明胶和糖例如乳糖、果糖和葡萄糖。也可使用天然的和合成的胶,包括阿拉伯胶、藻酸盐、甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。聚乙二醇、亲水性聚合物、乙基纤维素和蜡也可用作粘合剂。润滑剂在片剂配制中是必需的,以防止片和冲在冲模中粘住。润滑剂选自滑的固体例如滑石粉、硬脂酸镁和硬脂酸钙、硬脂酸及氢化植物油。

[0076] 含蜡材料的延长释放片剂通常用本领域已知的方法制备,例如直接掺混法、冻凝法和水分散体方法。在冻凝法中,将药物与蜡材料混合,并喷雾冻凝或冻凝,以及过筛和加工。

[0077] 延迟释放剂型

[0078] 延迟释放制剂通常通过用聚合物膜涂覆固体剂型产生,该膜在胃的酸性环境中不溶,而在小肠的中性环境中可溶。

[0079] 延迟释放剂量单位,例如可通过用所选择的涂料涂覆药物或含药物组合物制备。含药物组合物可以是,例如用于掺入到胶囊中的片,在“包衣芯”剂型中用作内芯的片,或用于掺入到片或胶囊中的许多含药物的珠、粒子或颗粒。优选的涂料包括可生物腐蚀的、可逐渐水解的、可逐渐水溶解的和/或可酶降解的聚合物,并且可以是常规的“肠溶”聚合物。如本领域技术人员将认识到的,肠溶聚合物在胃肠道下部较高的 pH 环境中变得可溶,或者在剂型通过胃肠道时缓慢腐蚀,同时可酶降解的聚合物被存在于胃肠道下部,特别是结肠中的细菌酶降解。用于实现延迟释放的合适的涂料包括但不限于纤维素聚合物例如羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、琥珀酸乙酸羟丙基甲基纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、乙酸纤维素、邻苯二甲酸乙酸纤维素、苯三酸乙酸纤维素和羧甲基纤维素钠;丙烯酸聚合物和共聚物,优选由丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯和/或甲基丙烯酸乙酯及其他商业上可以商品名 Eudragit® (Rohm Pharma, Westerstadt, Germany) 获得的甲基丙烯酸树脂形成,这些树脂包括 Eudragit® L30D-55 和 L100-55 (于 pH 5.5 及以上可溶)、Eudragit® L-100 (于 pH 6.0 及以上可溶)、Eudragit® S (于 pH 7.0 及以上可溶,由于较高的酯化度) 和 Eudragits® NE、RL 和 RS (具有不同程度渗透性和可膨胀性的水不溶性聚合物);乙烯基聚合物和共聚物例如聚乙烯吡咯烷酮、乙酸乙烯酯、邻苯二甲酸乙酸乙烯酯、巴豆酸乙酸乙烯酯共聚物和乙烯-乙酸乙烯酯共聚物;酶可降解的聚合物例如偶氮类聚合物、果胶、壳聚糖、直链淀粉和瓜尔胶;玉米蛋白和虫胶。也可使用不同涂料的组合。也可涂覆采用不同聚合物的多层涂层。

[0080] 特定涂料的优选涂层重量可以容易地由本领域技术人员,通过评价用不同量的各种涂料制备的片剂、珠剂和颗粒剂的各自释放曲线来确定。正是材料、方法和施用形式的组

合产生所期望的释放特性,这些特性只能由临床研究来测定。

[0081] 涂料组合物可包括常规添加剂,例如增塑剂、颜料、着色剂、稳定剂、助流剂等。通常存在增塑剂以减少涂层的脆性,且相对于聚合物干重计,将一般占约 10wt. % -50wt. %。典型的增塑剂的实例包括聚乙二醇、丙二醇、三醋精、邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二丁酯、癸二酸二丁酯、柠檬酸三乙酯、柠檬酸三丁酯、乙酰基柠檬酸三乙酯、蓖麻油和乙酰化甘油单酯。稳定剂优选用于稳定分散体中的颗粒。典型的稳定剂是非离子乳化剂例如脱水山梨醇酯、聚山梨醇酯和聚乙烯吡咯烷酮。建议助流剂用于减少膜形成和干燥期间的粘着作用,且以涂料溶液中聚合物重量计,将通常占约 25wt. % -100wt. %。一种有效的助流剂是滑石粉。也可使用其他助流剂例如硬脂酸镁和甘油单硬脂酸酯。也可使用颜料例如二氧化钛。少量的消泡剂例如聚硅氧烷(例如二甲基硅油)也可加入到涂料组合物中。

### [0082] 3. 其他活性剂

[0083] 其他活性剂可包含在本文所描述的组合物中。可以与本文所描述的颗粒共给予的合适类别的活性剂包括但不限于维生素 D,例如维生素 D3 和 / 或其功能等同物、生长因子、高血糖素样肽 -2、高血糖素样肽 -2 释放组合物、非甾体抗炎药、镇痛药及其组合。在一个实施方案中,维生素 D、一种或多种生长因子及其组合与锶强化钙颗粒共给药。

### [0084] III. 制备方法

#### [0085] 锶强化钙盐

[0086] 柠檬酸钙 / 锶和锶取代的磷酸三钙可用不同方法合成。柠檬酸钙和锶混合物可通过于室温、60°C 或反应混合物的沸腾温度下,用柠檬酸溶液中和氢氧化钙和锶混合物合成。由于柠檬酸钙和柠檬酸锶的络合物稳定性的差别,分开合成可减少能量输入,并提高该反应的总产率。柠檬酸钙的最佳合成温度是 60°C,而柠檬酸锶优选于 100°C 合成。作为替代,碳酸钙和锶可用于柠檬酸钙和锶的合成。氯化锶和柠檬酸钠 / 钾的置换反应用于产生具有高得多(例如 3 : 2)的锶与柠檬酸根比率的锶盐。

[0087] 对锶取代的磷酸三钙盐而言,磷酸的缓慢加入允许接近化学计量比率,以防止羟磷灰石和其他磷酸盐的形成。例如,磷酸通常以 0.01-20ml/ 小时的速度加入。与可获得的磷酸盐补充剂相比,该高温合成方法产生具有最高 Ca : 磷酸根和 Sr : 磷酸根比率的无水锶强化钙化合物。无水存在和较高 Ca : 磷酸根和 Sr : 磷酸根比率的存在在最终产物中允许较高的钙和锶含量。钙、锶和磷酸根含量的调节可通过加入其他钙盐或改变  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  比  $\text{Sr}(\text{OH})_2$  的摩尔比来实现。

[0088] 在另一个实施方案中,锶强化钙纳米颗粒可以通过以下方法来合成:在脂肪酸表面活性剂的存在下,在 80-200°C 的温度下,热水处理磷酸氢二铵和硝酸锶 / 氯化锶前体约 6- 约 24 小时的一段时间。

#### [0089] 涂层

[0090] 植入物涂层可用于防止腐蚀、提高生物相容性及增加界面强度。涂层通常通过喷雾涂覆,然而,喷涂技术可能遭受许多限制,包括涂料的分解和高热应力。等离子体喷涂通常用于将羟磷灰石涂覆于植入物表面上。由于涂层和基体之间的高界面强度,该方法被广泛使用。然而,高加工成本和羟磷灰石粉末的热分解是该技术的主要缺点。

[0091] 美国专利 No. 5, 171, 326 公开了采用微观粉末形式的磷酸钙材料及电泳沉积,产

生比前面的材料具有显著更高的溶出速度的陶瓷。然而,该方法需要高温烧结,以达到可接受的界面强度。

[0092] 电泳沉积可在复杂形状上提供低成本的羟磷灰石柔韧性涂层。先有技术中所采用的喷涂技术可产生不足的植入物应用的界面强度。涂层的烧结用于提高涂层与植入物之间的粘合强度。然而,高温下烧结具有两个缺点 - 羟磷灰石的热分解和金属的降解。采用提供高表面积纳米颗粒或供选择的颗粒或能提高界面强度并降低烧结温度的化学品,使得电泳沉积成为植入物涂覆的可使用的选择。

[0093] 纳米颗粒的电泳沉积或类似的低温沉积技术可提供具有低成本和低烧结温度的创造性加工方法。此类方法向常规等离子体喷涂提供了选择,并且更可应用于某些热敏感的羟磷灰石材料,例如碳酸羟磷灰石。优选的加工方法是电泳沉积法,优选的涂料是纳米尺寸的羟磷灰石或磷酸钙 / 锶化合物。采用高表面积纳米颗粒例如羟磷灰石或磷酸钙 / 锶化合物可将烧结温度降低到约 800°C 或更低。降低烧结温度使常规羟磷灰石涂层的分解和降解问题最小化。根据 ASTM F1044 的粘合强度测试表明,HAp 涂层与 Ti 基体的粘合强度是  $18 \pm 2.5$  MPa。截面形态学显示,该涂层具有高致密度,且在涂层体内无明显的孔。

[0094] MSCs 在纳米羟磷灰石涂层上的增殖比常规羟磷灰石或未涂覆的钛表面高。样品用 3'-[ 苯基 (phenyl) 氨基 - 羰基 ]-3,4- 四唑鎓 ]- 双 [4- 甲氧基 -6- 硝基 ] 苯磺酸水合物,通过 XTT 测定测量。四天后,纳米羟磷灰石刺激了涂层表面以及材料周围区域的细胞生长。根据 XTT 测定,MSCs 在纳米锶强化钙颗粒上增殖最快,而在 Ti 片上增殖最慢。

[0095] 纳米锶强化钙颗粒涂层通过电泳沉积 (EPD) 法产生,并于 20-1200°C,优选低于 800°C 的温度下烧结。该方法降低了涂层的热应力,生产成本比等离子体喷涂法低。含锶纳米羟磷灰石和特殊处理方法的采用消除了裂缝发展的问题。

[0096] 合适的基体包括但不限于金属和陶瓷基体。金属基体的实例包括但不限于钽、钴、铬、钴合金、铬合金、钛、钛合金、陶瓷及其组合。

[0097] IV. 使用锶强化钙盐的方法

[0098] 本文所描述的组合物可用于骨病或障碍,例如骨质疏松症的治疗和 / 或预防。这些组合物通常以固体或液体口服剂量制剂给药。或者,本文所描述的组合物可用作可注射的骨填料或支架,以治疗或预防骨折或其他相关的骨病。

[0099] 药用组合物

[0100] 在骨质疏松症患者中,由于削弱了成骨细胞的功能,仅进行钙补充剂治疗不能显著的提高骨矿物质的密度。由于没有合成新基质物质的成骨细胞,尽管有适当的血清钙浓度,新骨还是不能形成。高血清钙浓度抑制了再吸收,这解释了钙补充剂为什么可以减少骨质疏松症患者的骨损失。锶强化钙盐能改善老化和某些病理条件下恶化的成骨细胞功能引起的骨强度。成骨细胞合成了新的骨基质,并转运钙离子使其矿物化及填充再吸收腔。锶与钙盐组合能激活成骨细胞,并为骨矿物化提供足够的钙。由于较高的成骨细胞合成代谢活性和较高的矿物化速度,所以提高了骨的整体密度和强度。钙在占领钙转运蛋白上比锶具有竞争优势。转运蛋白与钙 : 锶的亲合力仅是 2 : 1。即使大量摄取钙,少量的锶也可被吸收,并刺激成骨细胞活性。通过改变 Ca : Sr 比率,可以改变锶在机体内的吸收速度。

[0101] 根据本文所描述的动物研究,与对照组和仅进行钙盐治疗组相比,锶强化钙盐在成骨因子表达和骨矿物质密度上显示出显著的改善。联合治疗 (低剂量 Sr) 增加了骨体积,

主要是通过增加小梁厚度（参见实施例）。单独 Ca 治疗降低了矿物质的沉积速度，而钙加锶治疗提高了矿物质沉积的速度（参见实施例）。

[0102] 腰椎骨单个小梁的机械特性的评价显示，虽然弹性模数上有很少或无变化及硬度仅有轻微减少，但是锶治疗后观察到增加的 E/H（与骨折韧性成比例）导致骨折危险减少。

[0103] 实施例也显示，虽然 IGF-II 的 mRNA 表达水平在该研究的所有四个组中未显示显著的差异，IGF-I 基因转录水平是 Sr 剂量依赖性上调的。当与接受单独 Ca 给药的动物相比时，接受锶强化钙组合物的动物中，IGF-I 基因表达增加并且显著上调。类似地，锶强化钙组合物的给药导致 Runx2 mRNA 的表达增加，而 G2 治疗轻微地减少了 Runx2 表达。另一方面，与对照相比，接受单独的钙或钙与锶联合的动物中，TNF- $\alpha$  的 mRNA 基因转录水平显著降低。这些发现表明，锶加钙能刺激成骨基因表达，从而诱导了新骨的形成。

[0104] 口服给药的剂量范围通常小于约 100mg/kg/天，优选约 24-40mg/kg/天。

[0105] 涂层

[0106] 对植入物固定而言，植入物表面处理在防止界面脱位中起重要作用。稳定、有效的涂层可以防止植入物的松弛，减少金属离子从植入物浸出，及减少植入物的腐蚀，特别是金属植入物。由高表面积锶强化钙颗粒制备的涂层提高了生物相容性，增加了界面强度，降低了烧结温度和 / 或降低了热应力。涂层通常由直径为约 10nm- 约 250 微米的颗粒制备。

[0107] 在一个实施方案中，涂料促进了间质干细胞 (MSCs) 的分化和 / 或成骨细胞的增殖和 / 或提高了骨致密化。涂层还可含有一种或多种活性剂，例如促进骨再生的活性剂。可与本文所描述的颗粒共给药的合适类别的活性剂包括但不限于维生素 D，例如维生素 D3 和 / 或其功能等同物、生长因子、高血糖素样肽 -2、高血糖素样肽 -2 释放组合物、非甾体抗炎药、镇痛药及其组合。在一个实施方案中，维生素 D、一种或多种生长因子及其组合与锶强化钙颗粒共给药。

[0108] 支架

[0109] 锶强化钙颗粒可用于制备用于骨组织工程的支架。制备此类支架的方法在本领域是熟知的。在一个实施方案中，将锶强化钙颗粒通过相分离与壳聚糖 - 明胶、藻酸盐和 / 或胶原混合，形成支架。

[0110] 骨填料

[0111] 在一个实施方案中，锶强化颗粒可用于制备生物活性骨填料或接合剂。例如，可将颗粒与粘合剂，例如硫酸钙混合，形成填料或接合剂。骨接合剂可用于填充空隙或将骨和 / 或整形外科硬件固定至骨。骨填料通常用于填充骨中的空隙或缺损。制备和给予骨填料和 / 或接合剂的方法在本领域是熟知的。可配制填料和 / 或接合剂，以提供持续释放的锶强化钙化合物。如上所讨论，与对照组和单独进行钙盐治疗组相比，锶强化钙化合物显示增加成骨因子表达和骨矿物质密度，并且能刺激成骨基因表达，因此诱导了新骨的形成。可施用锶强化钙骨填料，以稳定骨板或螺丝，或恢复已松弛的整形外科植入物的稳定性。

[0112] 除非另外定义，本文所使用的所有技术和科学术语均具有所公开发明所属领域的技术人员通常理解的含义。本文引用的出版物和它们引述的材料通过引用具体结合到本文中。

[0113] 本领域技术人员将认识到，或能够确定至多采用常规试验，可得到本文所述发明的具体实施方案的许多等同实施方案。此类等同实施方案将通过权利要求包括在内。

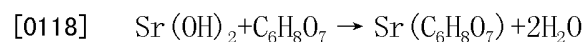
## 实施例

[0114] 实施例 1. 柠檬酸锶的合成和柠檬酸锶 / 柠檬酸钙掺混物的制备

[0115] 柠檬酸锶的合成

[0116] 将 0.5 摩尔柠檬酸一水合物溶于 500ml 蒸馏水中。将 0.5 摩尔氢氧化锶在搅拌下,分几批加入到柠檬酸溶液中并加热。将反应器用玻璃覆盖,以防止粘性液体的溢出。用超声使该溶液脱气,以帮助减少最终产物的碳酸盐含量。对一般食品级或补充剂用途而言,1-2%碳酸盐是可接受的。对更高纯度的产物而言,该反应器填充惰性气体例如氩气或氮气。

[0117] 将溶液加热 1 小时后,将溶液冷却到室温。加入有机溶剂例如丙酮、乙醇或丙醇,使络合物稳定,进一步提高该反应的收率。将沉淀物于 100℃ 下干燥。用机械手段,将柠檬酸锶盐与柠檬酸钙混合。描述柠檬酸锶和柠檬酸钙合成的反应显示如下:

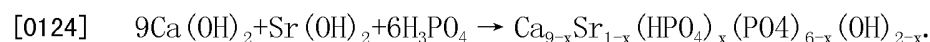


[0120] 柠檬酸锶 / 柠檬酸钙掺混物通过将柠檬酸锶和柠檬酸钙在陶瓷碗中粗略地混合制备。将该混合物反复过筛,直到得到均匀的混合物。该方法消除了块状颗粒,并产生均匀的混合物。锶强化柠檬酸钙颗粒的尺寸为 2-16 微米。

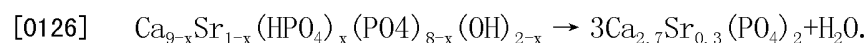
[0121] 实施例 2. 锶取代的磷酸三钙合成

[0122] 将 3.67 摩尔  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  和 0.41 摩尔  $\text{Sr}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  溶于 8L 蒸馏水中,并搅拌 1 小时。通过注射器泵,将 2.72 摩尔 (182.4ml)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  以 2ml/ 小时的速度滴加。加入  $\text{H}_3\text{PO}_4$  后,将溶液搅拌 1-2 天。采用真空抽吸,将磷酸三钙 / 锶沉淀物过滤,并于 110℃ 的烘箱中干燥 12 小时。将该沉淀物碾磨,并再于烘箱中烘焙 6 小时。然后将该沉淀物于 800℃ 的熔炉中加热处理 3 小时。将熔炉的温度以 50℃ / 15 分钟升高,直到达到 800℃。于 800℃ 加热 3 小时后,将熔炉冷却,得到绿白色粉末。收率约为 84.8%。锶取代的磷酸三钙的粒度为 100nm-7.41  $\mu\text{m}$ 。不进行热处理,粒度为 100nm-24.14  $\mu\text{m}$ 。

[0123]  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、 $\text{Sr}(\text{OH})_2$  和  $\text{H}_3\text{PO}_4$  的反应给出中间体不足的羟磷灰石:



[0125] 该不足的磷灰石转化成  $\beta$ -锶取代的磷酸钙



[0127] 为了减少颗粒的聚集,在过滤过程期间向最终混合物中加入少量正丁醇。

[0128] 对于最终产物的分析,由于缺乏锶 (Sr) 干扰,所以采用电感耦合等离子体原子发射光谱法 (ICP-AES)。ICP-AES 用于获得锶强化钙化合物的准确的钙和锶含量。采用 X-射线的扫描电子显微镜 / 能量色散 (SEM/EDX) 分析用于测定粒度和样品中的 Ca/Sr 均匀度。图 1 和 2 显示 FTIR 结果。将图谱与标准图谱比较。

[0129] 图 1 是柠檬酸钙 / 锶的 IR 图谱。图 1 显示归属于  $-\text{COO}^-$  的反对称和对称模式谱带分别存在于 1550-1650 $\text{cm}^{-1}$  和 1440-1360 $\text{cm}^{-1}$ 。3000-3600 $\text{cm}^{-1}$  处具有氢键谱带的归属于  $-\text{OH}$  的强且宽的吸收显示该混合物是水化的盐。

[0130] 图 2 是锶取代的磷酸三钙的 FTIR 图谱。该 IR 图谱表明在该化合物中存在磷酸三锶和  $\beta$ -TCP。604 $\text{cm}^{-1}$  和 1033 $\text{cm}^{-1}$  处的吸收显示在样品中存在  $\text{PO}_4$ 。

[0131] 图 3 中显示了磷酸三钙 / 锶的 X-射线衍射 (XRD) 图谱。峰型是  $\beta$ -磷酸三钙和磷酸三锶的组合。

[0132] 实施例 3. 纳米柠檬酸钙 / 锶的合成

[0133] 通过将 0.1M 柠檬酸钠 (溶液 A, 280mL) 和 0.1M 氯化钙与 0.05M 氯化锶的混合物 (溶液 B, 450mL) 置于分散装置中, 来制备微乳液。将该混合物以 5000rpm 的速度匀化 45 分钟。将固相离心分离。沉淀物用乙醇 / 二氯乙烷洗涤, 并再用乙醇洗涤三次。于 100℃ 下干燥纳米颗粒。所得颗粒的长度为约 500nm, 厚度为约 35-150nm。

[0134] 实施例 4. 植入物上的纳米钙和锶材料涂层

[0135] 锶强化钙纳米颗粒的合成

[0136] 用氨将  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  溶液的 pH 调节到大于 10。将溶液以 Ca+Sr 的化学计量比率混合至  $P = 1.67$ 。反应完成后, 用蒸馏水冲洗沉淀物几次, 直到 pH 值降到 7。为了避免干燥期间超细粉末的严重聚集, 将沉淀物中的水用正丁醇置换。然后将该沉淀物于 80℃ 下干燥, 并于 400℃ 下煅烧, 除去任何有机残留物。沉积前, 将痕量的聚集颗粒过筛除去。

[0137] Ti 表面的制备

[0138] 将钛切成所期望的尺寸, 并用碳化硅纸抛光。对钛进行表面粗糙度处理, 接着用 1 : 1 硫酸和过氧化氢混合物蚀刻和氧化。纳米锶强化钙颗粒涂层通过 EPD 法 (10V DC 场, 1 分钟) 制备, 并于 800℃ 下烧结。

[0139] 实施例 5. 锶强化钙组合物的体内研究

[0140] 在治疗开始之前 1 年, 将 18 只 6-8 年龄的山羊切除卵巢, 以诱导骨质疏松症。动物给予随机编号, 使观察者难以识别样品的组织形态。如表 1 所示, 将山羊随机分成四组。

[0141] 表 1. 动物研究

组	治疗		数目
	mg Ca/kg/天	mg Sr/kg/天	
对照 (G1)	0	0	3
Ca (G2)	100	0	5
Ca + L.Sr (G3)	100	24	5
Ca + H.Sr (G4)	100	40	5

[0142] Ca+L. Sr 含 100mg Ca/kg/ 天和 24mg Sr/kg/ 天。Ca+H. Sr 含 100mgCa/kg/ 天和 40mg Sr/kg/ 天。

[0144] 处死前 14 天和 3 天, 给每只动物注射 20mg/kg 四环素 (土霉素, Pfizer), 以在活性骨形成部位得到双荧光标记。治疗开始后 16 周将所有动物处死。

[0145] 血清锶水平

[0146] 治疗前和后测定血清钙和锶水平。测定结果如表 2 所示。

[0147] 表 2. 治疗前和后的血清锶水平



组	治疗前		治疗后	
	Ca (mg/L)	Sr (mg/L)	Ca (mg/L)	Sr (mg/L)
[0148] G1	96.8±5.657	0.240±0.014	112.83±19.300	0.293±0.101
G2	94.9±5.726	0.285±0.035	101.40±15.365	0.214±0.027
G3	94.4±1.131	0.315±0.007	90.40±16.199	1.698±0.303
G4	92.8±3.124	0.265±0.035	109.06±20.541	3.092±0.691

[0149] 治疗后的血清锶水平如图 4 中的图所示。在仅接受 Ca 治疗的组 (G2) 中, 血清 Sr 浓度的水平与对照组的那些没有差异。G1 和 G2 组的血清 Sr 浓度的平均水平分别是  $0.29 \pm 0.09$  和  $0.21 \pm 0.03 \text{ mg/L}$ 。相反, G3 和 G4 组的血清 Sr 浓度分别显著增加到  $1.70 \pm 0.30$  和  $2.10 \pm 0.70 \text{ mg/L}$ 。G3 和 G4 中, Sr 摩尔比分别随治疗剂量依赖性增加 ( $0.9\%$ 、 $1.3\% \text{ Sr}/(\text{Sr}+\text{Ca})$ )。

[0150] 骨锶水平

[0151] 股骨和腰椎骨的锶水平如图 5 中显示。在 G3 和 G4 中, Sr 治疗组的腰椎骨中骨 Sr 水平分别剂量依赖性增加了 4 倍和 6 倍。此外, 在 G3 和 G4 中, 股骨的 Sr 水平分别增加到  $571 \pm 158$  和  $738 \pm 42 \text{ mg/kg}$ 。

[0152] 骨密度

[0153] Ca 单独或 Ca 与 Sr 联合治疗对腰椎骨调节的骨矿物质密度 (BMD) 的作用在组间不同。结果在表 3 中显示。

[0154] 表 3. 显微计算机 x 断层摄影术 (微 CT) 测定的腰椎骨微观结构

参数	试验组			
	对照	Ca	Ca+L.Sr	Ca+H.Sr
BMD 表观	191.606±17.383	198.365±10.123	<b>208.074±10.326*</b>	201.927±1.169
BMD 材料	765.760±18.401	749.037±21.540	752.585±31.691	743.337±44.581
BV/TV	0.180±0.006	0.184±0.009	<b>0.202±0.013*</b>	0.181±0.017
[0155] Tb.Th* (mm)	0.164±0.017	0.186±0.020	<b>0.188±0.001*</b>	<b>0.190±0.016*</b>
Tb.Sp* (mm)	0.474±0.062	0.519±0.135	0.435±0.048	0.432±0.045
Tb.N* (1/mm)	2.337±0.593	2.123±0.656	2.559±0.432	2.618±0.530
SMI	0.491±0.021	0.427±0.073	0.485±0.110	0.498±0.058
Conn.D (1/mm <sup>3</sup> )	2.955±0.784	3.419±0.036	3.789±1.010	<b>4.003±2.008*</b>

[0156] 联合治疗 (低剂量 Sr) 增加了骨体积, 主要通过增加小梁厚度 (参见表 3 中的粗体测量值)。G4 中腰椎骨的 BMD 增加了  $9.4\%$ 。

[0157] 四组的骨矿物质沉积速度 (MAR) 分别是  $1.95 \pm 0.23$ 、 $1.65 \pm 0.20$ 、 $2.03 \pm 0.25$  和  $2.10 \pm 0.22 \mu\text{m}/\text{天}$ 。单独 Ca 治疗 (G2) 减少了矿物质沉积速度  $15.4\%$ , 而 Ca+L. Sr 治疗增加了矿物质沉积速度  $4.1\%$ 。然而, Ca+H. Sr 治疗增加了矿物质沉积速度  $7.9\%$  ( $p = 0.026$ )。

[0158] 力学研究

## [0159] 纳米压痕法研究

[0160] 压痕试验,有时称为硬度试验,或许是测试材料机械特性的最通常采用的手段。该技术起源于矿物质硬度的莫氏硬度标,其中根据它们可刮及反过来被刮的东西将材料分级。固体按该方式表征发生在基本上不连续的刻度上,为了开发在连续范围内评价材料硬度的技术已进行了如此多的努力。最近(约1975),作为研究小体积材料硬度的主要工具建立了纳米压痕技术。

[0161] 在纳米压痕法中,采用小的负荷和尖的大小,所以压痕面积仅可能是几平方微米或甚至是纳米。这在测定硬度中提出了问题,因为接触区域不容易发现。原子力显微镜或扫描电子显微镜技术可用于为压痕成像,但是可能是相当麻烦的。作为替代,采用具有已知高度精确的几何学的压痕器(通常是 Berkovich 尖端,它具有三面角锥几何形状)。在器械压痕法的过程期间,记录穿透的深度,然后用已知几何学的压痕尖端测定压痕的面积。压痕时,可测定各种参数,例如负荷和穿透的深度。可将记录的这些值在图上作图,形成负荷-位移曲线。这些曲线可用于获得材料的机械特性。

[0162] 纳米压痕试验在单一的腰椎骨小梁上进行。结果在表4中显示。

[0163] 表4. 治疗后单一腰椎骨小梁的机械特性

[0164]

组	弹性模数, E (Gpa)	硬度, H (MPa)	E/H
对照	14.025 ± 0.017	685.800 ± 37.937	20.790 ± 0.707
Ca	12.652 ± 1.102	610.146 ± 62.170	20.970 ± 0.461
Ca+L. Sr	14.017 ± 0.297	639.959 ± 63.869	22.378 ± 2.100
Ca+H. Sr	13.542 ± 0.665	642.025 ± 28.620	22.187 ± 0.720

[0165] 如表4所示,弹性模数有很少或无变化,而硬度仅有轻微降低。然而,E/H(与骨折韧性成比例)增加是锶治疗后观察到的骨折风险减少的原因之一。

[0166] 也测定了对整个椎骨体的压迫。结果在表5中显示。

[0167] 表5. 最大负荷和刚度

[0168]

组	最大负荷 (N)	刚度 (N/mm)
对照	5292.50 ± 900.15	3085.24 ± 554.21
Ca	5219.00 ± 1598.45	2906.69 ± 544.24
Ca+L. Sr	6467.00 ± 959.11	2975.23 ± 278.21

组	最大负荷 (N)	刚度 (N/mm)
Ca+H. Sr	5518.50±849.23	3233.85±370.31

[0169] 靶基因的表达

[0170] 以骨重构的标记,测定了 IGF-I、IGF-II、TNF- $\alpha$  和 Runx2 的骨基质水平。结果在图 6 中显示。虽然在该研究的所有四个组中,IGF-II 的 mRNA 表达水平未显示显著的差异,但是 IGF-I 基因转录水平是 Sr 剂量依赖性上调的。与接受单独 Ca 给药的 G1 动物相比时,G3 中 IGF-I 基因表达增加,且在 G4 动物中显著上调。

[0171] 类似地,将制剂给予 G3 和 G4 导致 Runx2 mRNA 的表达增加,而 G2 中的治疗轻微地减少了 Runx2 的表达。另一方面,与 G1 相比时,TNF- $\alpha$  的 mRNA 基因转录的水平在 G2、G3 和 G4 中显著降低。这些发现表明,锶加钙可刺激成骨基因表达,因此诱导了新骨的形成。

[0172] 成骨细胞分化

[0173] 也观察到锶的给药促进了成骨细胞的分化。这通过碱性磷酸酯酶 (ALP) 染色和 ALP 定量证实。ALP 定量的结果在图 7 中显示。如图 7 所示及经 ALP 染色证实,锶治疗增加了成骨细胞的分化,特别是在 14 天后。锶治疗也增加了骨原细胞的基质矿物化。

[0174] 实施例 6. 锶羟磷灰石纳米丝的制备

[0175] 搅拌下,将 5g 氢氧化钠、40g 油酸和 160ml 乙醇混合。通过将 6.44g 硝酸锶溶于 75ml 蒸馏水,制备硝酸锶溶液。将硝酸锶溶液加入到上述混合物中。将 5g 磷酸钠溶于 75ml 蒸馏水中。将磷酸钠溶液加入到油酸锶盐混合物中。将该混合物搅拌约 10 分钟,然后转移到 500ml 聚四氟乙烯衬里的高压釜中,将该高压釜密封,并于 160℃ 下热水处理 15 小时。

[0176] 因为脂肪酸锶盐比其钙相应物具有更高的密度,所以为除去脂肪酸锶盐,用蒸馏水洗涤是必要的,接着用 70% 乙醇和脱水的无水乙醇洗涤。

[0177] 纳米丝用扫描电子显微镜 (SEM) 表征。纳米丝的长度为约  $2.43 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ,且直径为约  $81 \pm 12\text{nm}$ 。

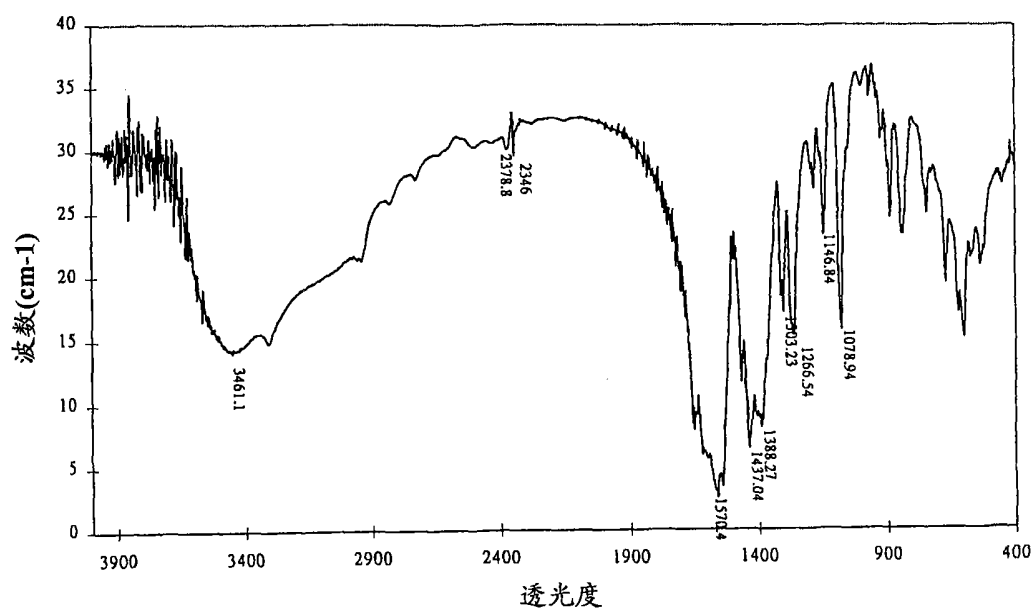


图 1

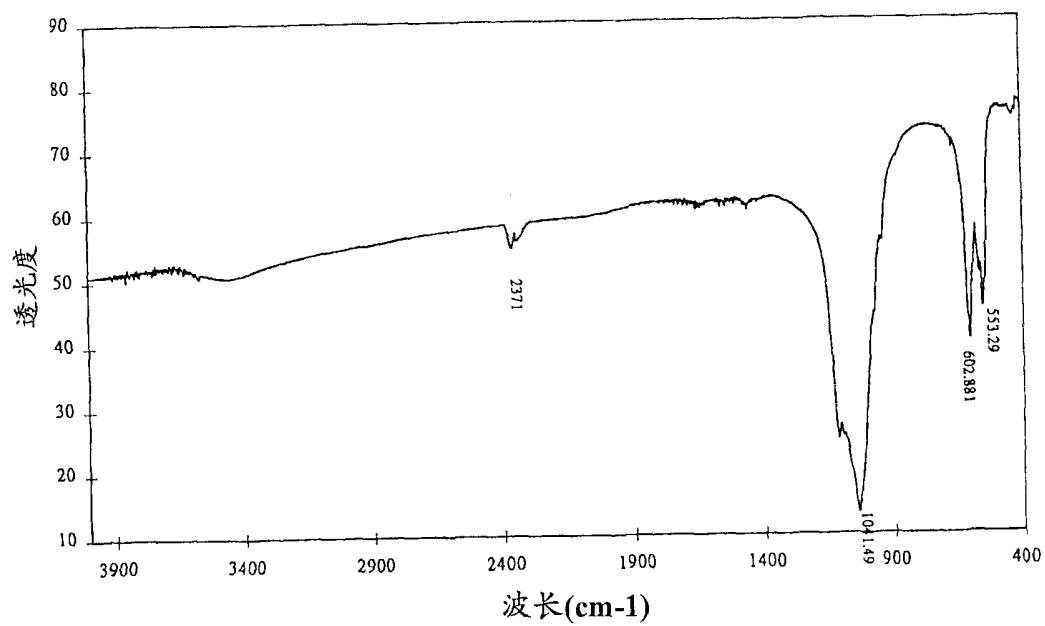


图 2

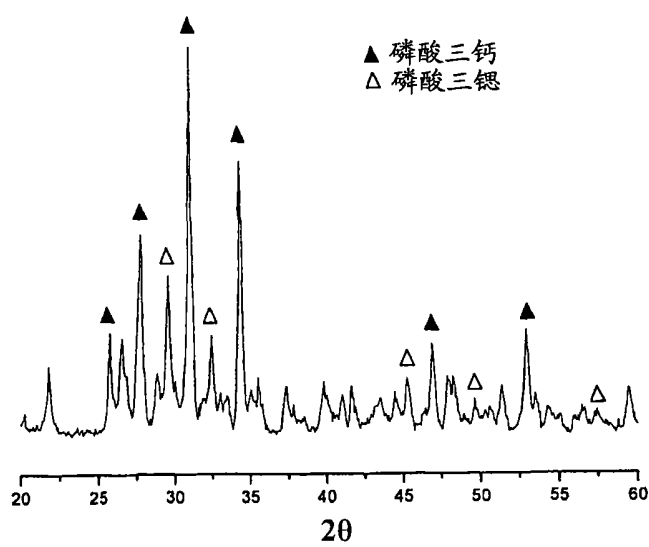


图 3

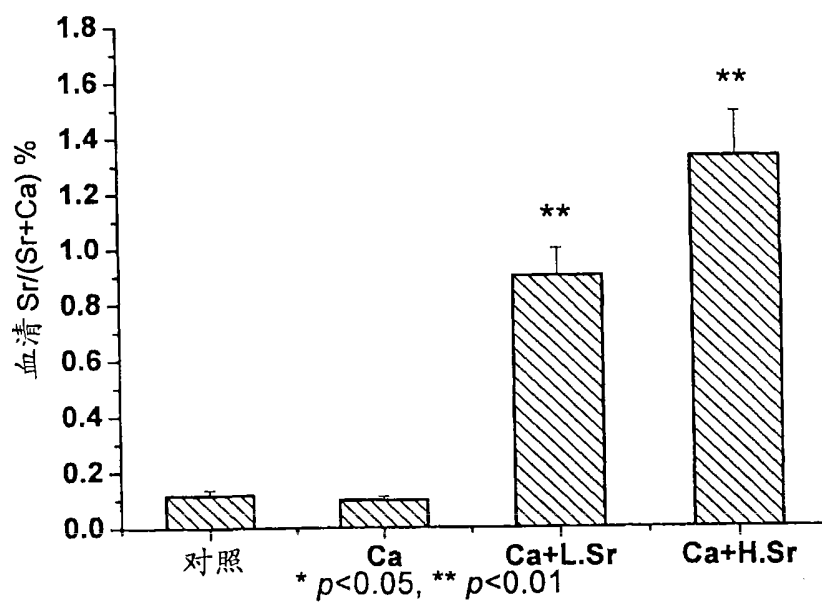


图 4

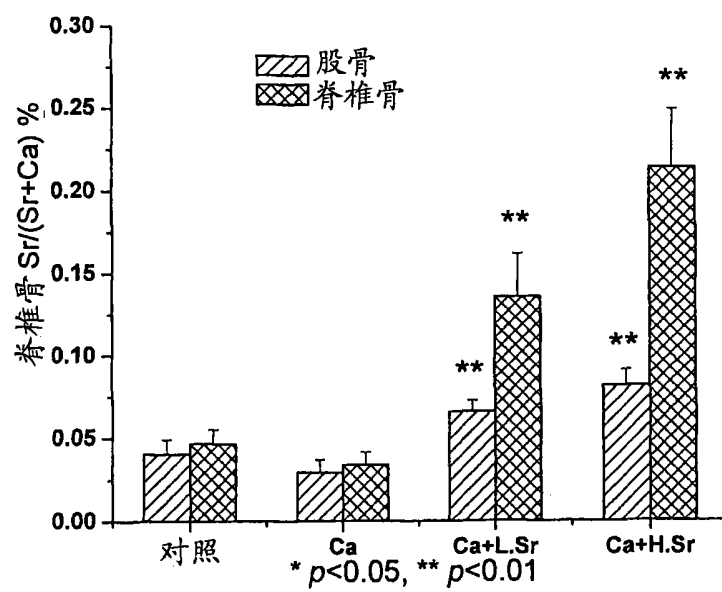


图 5

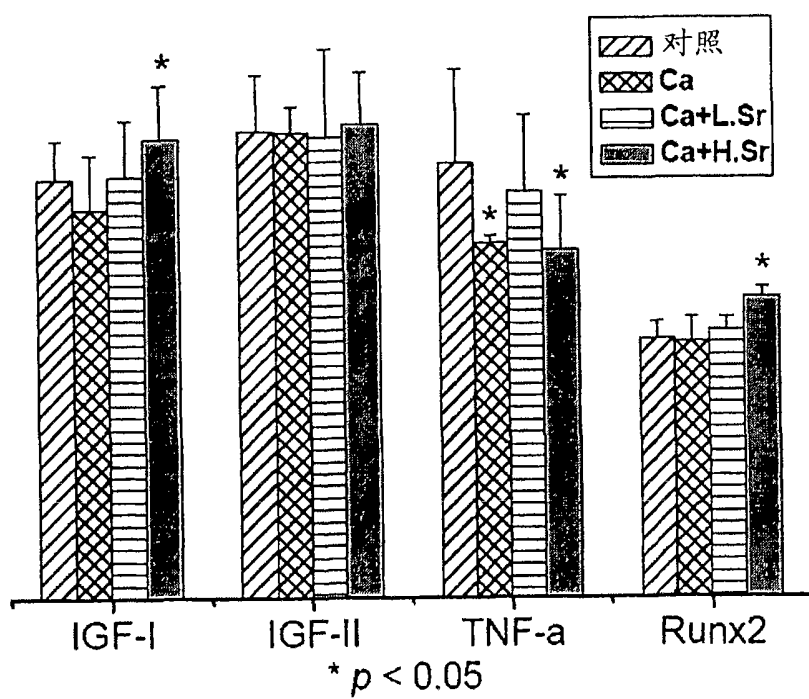


图 6

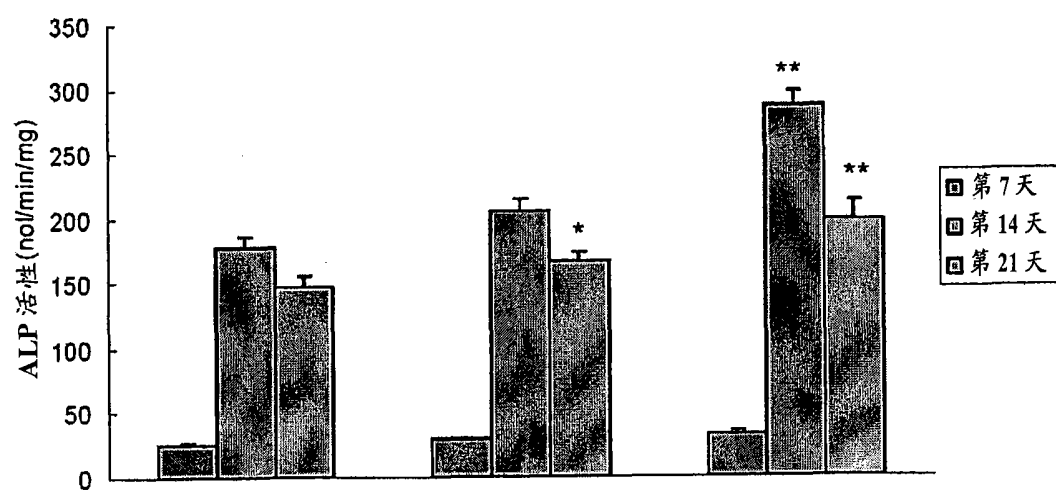


图 7